

**MEASURING CHIP FOR SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR**

**Patent number:** JP2003075447  
**Publication date:** 2003-03-12  
**Inventor:** SHINOKI HIROSHI; SESHIMOTO OSAMU  
**Applicant:** FUJI PHOTO FILM CO LTD  
**Classification:**  
- international: **G01N21/55; G01N33/543; G01N33/553; G01N21/55;  
G01N33/543; G01N33/551; (IPC1-7): G01N33/543;  
G01N21/27; G01N33/553**  
- european: **G01N21/55B2; G01N33/543M; G01N33/553**  
**Application number:** JP20010265483 20010903  
**Priority number(s):** JP20010265483 20010903

**Also published as:**

US6726881 (B2)  
US2003073245 (A1)

**Report a data error here**

**Abstract of JP2003075447**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a measuring chip for surface plasmon resonance biosensors which achieves a higher sensitivity along with an easier production. **SOLUTION:** The measuring chip for surface plasmon resonance biosensors has a transparent substrate, a metal film arranged on the transparent substrate and an organic silicon film fixed on the metal film. The organic silicon film is fixed on the metal film through an aromatic group bondable to atoms on the metal surface.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-75447

(P2003-75447A)

(43) 公開日 平成15年3月12日 (2003.3.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 9 5	G 0 1 N 33/543	5 9 5 2 G 0 5 9
21/27		21/27	C
33/553		33/553	

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2001-265483(P2001-265483)

(22) 出願日 平成13年9月3日 (2001.9.3)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 篠木 浩

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フイルム株式会社内

(72) 発明者 瀬志本 修

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フイルム株式会社内

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ

(57) 【要約】

【課題】 良好な感度が得られ、かつ製造が容易な表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定チップを提供すること。

【解決手段】 透明基板、該透明基板上に配置された金属膜、並びに該金属膜上に固定化された有機ケイ素膜を有し、有機ケイ素膜が、金属表面の原子と結合しうる官能基を介して該金属膜上に固定化されていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

(2) 開2003-75447 (P2003-7UIXA)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 透明基板、該透明基板上に配置された金属膜、並びに該金属膜上に固定化された有機ケイ素膜を有し、有機ケイ素膜が、金属表面の原子と結合しうる官能基を介して該金属膜上に固定化されていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項2】 有機ケイ素膜が、金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤により形成された膜であることを特徴とする、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項3】 有機ケイ素膜が、金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、生理活性物質と結合することができる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合物により形成された膜である、請求項1または2に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

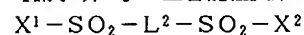
【請求項4】 金属表面の原子と結合しうる官能基が、ジスルフィド基、スルフィド基、ジセレニド基、セレニド基、メルカプト基、ニトリル基、イソニトリル基、ニトロ基、セレノール基、3価リン酸化合物に由来する基、イソチオシアネート基、キサンテート基、チオカルバメート基、ホスフィン基、チオ酸基、またはジチオ酸基である、請求項1から3のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項5】 金属表面の原子と結合しうる官能基がメルカプト基である、請求項4に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項6】 有機ケイ素膜が、メルカプト基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、アミノ基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合物により形成された膜である、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項7】 有機ケイ素膜にさらに二官能性試薬が結合していることを特徴とする、請求項1から6の何れかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項8】 二官能性試薬が、下記式：



〔上記の式において、 $X^1$ および $X^2$ は互いに独立に、 $-CR^1=CR^2R^3$ 、または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし； $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； $Y$ は、ハロゲン原子、 $-OSO_2R^{11}$ 、 $-OCOR^{12}$ 、 $-$

$OSO_3M$ 、及び四級ピリジニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； $R^{11}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる基を表わし； $R^{12}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基および炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基からなる群より選ばれる基を表わし； $M$ は、水素原子、アルカリ金属原子およびアンモニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし；そして、 $L^2$ は連結基を表わす〕で表わされるジスルホン化合物である、請求項7に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項9】 有機ケイ素膜に直接または二官能性試薬を介して生理活性物質が固定化されている、請求項1から8の何れか1項に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー。

【請求項10】 透明基板上に配置された金属膜を、金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、生理活性物質と結合することができる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合物で処理することにより、該金属膜上に有機ケイ素膜を形成する工程を含む、請求項1から8のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップの製造方法。

【請求項11】 請求項9に記載の生理活性物質が固定化されている表面プラズモン共鳴バイオセンサーと、目的物質を含む試料とを接触させて、該バイオセンサー上に固定化された生理活性物質と目的物質との相互作用を検出および／または測定することを特徴とする、生理活性物質と相互作用する物質の検出および／または測定する方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ、その製造方法、並びにその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、臨床検査等で免疫反応を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、リガンドの変化を高感度に検出することのできる表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した免疫センサーが使用されている。

【0003】このような表面プラズモン共鳴を利用した測定装置（表面プラズモン共鳴バイオセンサー）で一般的に使用される測定チップは、ガラス基板上に成膜された金属膜の上に、多孔性材料が形成されており、この多孔性材料の表面及び内部に酵素、抗体等の生理活性物質が担持又は固定されている。この多孔性材料としては、

(3) 開2003-75447 (P2003-78涵織

例えば合成繊維、天然繊維、無機繊維等からなる織物、絹物、不織布や、多孔性の無機又は有機材料などが使用される(特開平3-164195号公報参照)。また、市販品(BIAcore 2000用、ファルマシアバイオセンサー社製)では、この多孔性材料としてカルボキシメチルデキストランが用いられている。

【0004】また、生理活性物質を金属膜に固定する方法として、LB(Langmuir-Blodgett)法が用いられる場合もあるが(特開平5-288672号公報参照)、LB膜と金属膜との結合が弱く、LB膜が生理活性物質と共に脱落するという問題がある。

【0005】また、特開平10-267834号公報にはシランカップリング剤を用いて、金表面に有機ケイ素膜を形成して、シランカップリング剤の官能基、例えばアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基からさらに二官能性試薬を用いて、例えばタンパク質を金表面に化学修飾して、SPRのセンサーチップを作成することが開示されている。しかし、この方法では金表面とのシランカップリング剤との反応性が低く、再現性良く有機ケイ素膜を作成することはできない。また、特許第2815120号公報には金表面にメルカプト基を利用して、表面に官能基、例えばカルボキシル基、アミノ基を導入する方法が開示されている。

【0006】  
【発明が解決しようとする課題】本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、良好な感度が得られ、かつ製造が容易な表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定チップを提供することである。本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、金属膜上にメルカプト基を介して固定化した有機ケイ素膜を形成し、該有機ケイ素膜から官能基を介して、生理活性物質を固定化すれば、良好な感度が得られることを見出し、本発明を完成した。

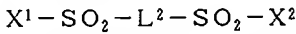
【0007】即ち、本発明によれば、透明基板、該透明基板上に配置された金属膜、並びに該金属膜上に固定化された有機ケイ素膜を有し、有機ケイ素膜が、金属表面の原子と結合しうる官能基を介して該金属膜上に固定化されていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップが提供される。

【0008】好ましくは、有機ケイ素膜は、金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤により形成された膜である。好ましくは、有機ケイ素膜は、金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、生理活性物質と結合することができる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合物により形成された膜である。

【0009】好ましくは、金属表面の原子と結合しうる官能基は、ジスルフィド基、スルフィド基、ジセレニド基、セレニド基、メルカプト基、ニトリル基、イソニト

リル基、ニトロ基、セレノール基、3価リン酸化合物に由来する基、イソチオシアネート基、キサンテート基、チオカルバメート基、ホスフィン基、チオ酸基、またはジチオ酸基であり、特に好ましくは、メルカプト基である。好ましくは、有機ケイ素膜は、メルカプト基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、アミノ基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合物により形成された膜である。

【0010】本発明の別の態様によれば、有機ケイ素膜にさらに二官能性試薬が結合している表面プラズモン共鳴バイオセンサーが提供される。好ましい二官能性試薬は、下記式：



[上記の式において、 $X^1$ および $X^2$ は互いに独立に、 $-CR^1=CR^2R^3$ 、または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし； $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； $Y$ は、ハロゲン原子、 $-OSO_2R^{11}$ 、 $-OCOR^{12}$ 、 $-OSO_3M$ 、及び四級ビリジニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； $R^{11}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる基を表わし； $R^{12}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基および炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基からなる群より選ばれる基を表わし； $M$ は、水素原子、アルカリ金属原子およびアンモニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし；そして、 $L^2$ は連結基を表わす]で表わされるジスルホン化合物である。

【0011】本発明のさらに別の態様によれば、有機ケイ素膜に直接または二官能性試薬を介して生理活性物質が固定化されている上記した表面プラズモン共鳴バイオセンサーが提供される。本発明のさらに別の態様によれば、透明基板上に配置された金属膜を、金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、生理活性物質と結合することができる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合物で処理することにより、該金属膜上に有機ケイ素膜を形成する工程を含む、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップの製造方法が提供される。

【0012】本発明のさらに別の態様によれば、本発明の生理活性物質が固定化されている表面プラズモン共鳴バイオセンサーと、目的物質を含む試料とを接触させて、該バイオセンサー上に固定化された生理活性物質と目的物質との相互作用を検出および/または測定するこ

## (4) 開2003-75447 (P2003-7Gch) 織

とを特徴とする、生理活性物質と相互作用する物質の検出および／または測定する方法が提供される。

## 【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。本発明のバイオセンサー用測定チップは、透明基板、該透明基板上に配置された金属膜、並びに該金属膜上に固定化された有機ケイ素膜を有し、有機ケイ素膜が、金属表面の原子と結合しうる官能基を介して該金属膜上に固定化されていることを特徴とする。

【0014】本発明のバイオセンサー用測定チップは、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ等として用いることができる。なお、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップとは、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用されるチップであって、該センサーより照射された光を透過及び反射する部分、並びに生理活性物質を固定する部分とを含む部材を言い、該センサーの本体に固着されるものであってもよく、また脱着可能なものであってもよい。

【0015】表面プラズモン共鳴の現象は、ガラス等の光学的に透明な物質と金属薄膜層との境界から反射された単色光の強度が、金属の出射側にある試料の屈折率に依存することによるものであり、従って、反射された単色光の強度を測定することにより、試料を分析することができる。

【0016】本発明のバイオセンサー用測定チップは、金属膜を本明細書に定義するシランカップリング剤で処理することにより製造される。本発明では金属膜は透明基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置される」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む意味である。

【0017】本発明で使うことができる基板としては例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、固定化法に使用されるものであればどのようなものでもよく、一般的にはガラス、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。基板の厚さは特に限定されないが、通常0.1～20mm程度である。

【0018】本発明のバイオセンサー用測定チップにおける金属膜としては、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。この金属膜に使用することのできる金属の種類としては、金、銀、銅、アルミニウム、白金等が挙げられ、それらを単独又は組み合わせて使用することができる。また、上記基板への付着性を考慮して、基板と金、銀等からなる層との

間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【0019】金属膜の膜厚は任意であるが、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、100～2000オングストロームであるのが好ましく、特に200～600オングストロームであるのが好ましい。3000オングストロームを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、5～50オングストロームであるのが好ましい。

【0020】金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。

【0021】本発明のバイオセンサー用測定チップでは、有機ケイ素膜が金属膜上に固定化されており、具体的には、金属表面の原子と結合しうる官能基を介して有機ケイ素膜が金属膜上に固定化されている。

【0022】本発明において「金属表面の原子と結合しうる官能基を介して該金属膜上に固定化されている」とは、金属表面の第1層にメルカプト基などの金属表面の原子と結合しうる官能基が存在し、さらにその上の第2層上にSi-O結合及びSi-C結合を分子内に含む高分子からなる膜が存在する状態を意味する。このような有機ケイ素膜は、例えば、金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤により形成することができる。シランカップリング剤とは、その分子中にビニル基、エポキシ基、アミノ基、メルカプト基のような有機材料と親和性のある有機官能基と、メトキシ基、エトキシ基のような無機材料と親和性のある加水分解基を有する有機ケイ素化合物のことをいう。

【0023】本発明における有機ケイ素膜は、好ましくは、金属表面の原子と結合しうる官能基（例えば、メルカプト基など）を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、生理活性物質と結合することができる官能基（例えば、アミノ基など）を有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合物により形成された膜である。金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤と、生理活性物質と結合することができる官能基を有する少なくとも1種類以上のシランカップリング剤との混合比率（モル比率）は特に限定されないが、好ましくは1：10から10：1の範囲内であり、より好ましくは、1：5～5：1の範囲内であり、さらに好ましくは1：2～2：1の範囲内である。

【0024】本発明で用いる第1のシランカップリング剤は、その分子中に金属表面の原子と結合しうる官能基を含有する有機ケイ素化合物である。金属表面の原子と結合しうる官能基としては、ジスルフィド基（-SS-）、スルフィド（-S-）、ジセレンイド（-SeSe-

## (5) 開2003-75447 (P2003-7%E 織

ー)、セレニド(−Se−)、チオール(−SH)、ニトリル(−CN)、イソニトリル、ニトロ(−NO<sub>2</sub>)、セレノール(−SeH)、3価リン酸化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、チオ酸またはジチオ酸(−COSH、−CSSH)等が挙げられ、特に好ましくはメルカプト基である。第1のシランカップリング剤としては、具体的には、3−メルカプトプロピルトリメトキシシラン、ジメトキシ−3−メルカプトプロピルメチルシランなどを単独又は組み合わせて使用することができる。

【0025】本発明で用いる第2のシランカップリング剤は、その分子中に生理活性物質と結合することができる官能基(例えば、アミノ基など)を有する有機ケイ素化合物のことをいう。具体的には、3−アミノプロピルトリエトキシシラン、3−アミノプロピルトリメトキシシラン、3−アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3−(2−アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3−(2−アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシランなどを単独又は組み合わせて使用することができる。

【0026】また、生理活性物質を化学結合で固定化するために、生理活性物質と結合することができる官能基を別途導入してもよい。例えば、金表面に3−メルカプトプロピルトリメトキシシランで処理後、3−アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ化シランカップリング剤で再び処理して、表面にアミノ基を導入することもできる。アミノ化シランカップリング剤としては、3−アミノプロピルトリメトキシシラン、3−アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3−(2−アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3−(2−アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシランなどが挙げられる。あるいは、例えば、金表面に3−メルカプトプロピルトリメトキシシランと3−アミノプロピルトリエトキシシランの混合物を同時に処理することで、1段階で、表面にアミノ基を導入を導引することができる。

【0027】有機ケイ素膜は、ケイ素原子が上下方向に重ならない単分子層膜であることが好ましい。単分子層膜にすることにより、生理活性物質と相互作用する測定対象物と、入射した光が反射する面との距離を短くすることができ、良好な感度が得られるとともに、使用するシランカップリング剤の量を必要最小限に抑え、コストの低減化を図ることができる。

【0028】さらにまた、有機ケイ素膜は、細密充填構造をとるのが好ましい。細密充填構造とは、有機ケイ素膜を構成するSi及びOの網目構造中に他の分子が貫入する余地のないほど、網目構造が緻密であることをいう。細密充填構造をとることにより、生理活性物質を高い密度で均等に固定化することができ、測定感度を向上させることができる。有機ケイ素膜が細密充填構造をと

るかどうかは、以下の方法により確認することができる。即ち、好適なプロピルエトキシシラン剤を用いて金属膜上に有機ケイ素膜を形成させる。次いで、シリンジにより蒸留水を滴下した際に表面が一様に水滴を弾くのであれば有機ケイ素膜は細密充填構造をとっており、表面が部分的にしか水を弾かないのであれば、細密充填構造をとっておらず、Si及びOの網目構造に空隙が存在することが推測される。

【0029】有機ケイ素膜は、上記したようなシランカップリング剤を用いることにより形成させることができる。具体的には、シランカップリング剤の飽和蒸気中に金属膜を一定時間暴露する方法(飽和蒸気法)、シランカップリング剤を含む溶液中に金属膜を一定時間浸漬する方法(浸漬法)、スピンコートを用いる方法(スピンコーティング法)、グラビア印刷機を用いる方法(グラビア法)などにより成膜することができる。本発明においては、これらのいずれの方法を用いてもよい。特に、細密充填構造をとる単分子層膜を形成させるためには、飽和蒸気法を用いるのが好ましい。

【0030】飽和蒸気法においては、暴露時の温度、湿度なども単分子層構造及び細密充填構造の形成に影響を与えるが、暴露時間が最も重要な要素である。暴露時間が長すぎると単分子層構造が得られず、また、暴露時間が短すぎると細密充填構造が得られない。暴露時間は、通常、1〜600分とするのが好ましく、15〜90とするのが更に好ましい。

【0031】本発明で用いるシランカップリング剤は、以下のような利点を有する。

(1) 生理活性物質を金属膜に極めて近い位置に固定化することができるので、従来の固定化法を使用する場合よりも大幅に測定感度を向上させることができる。

(2) 表面処理が容易であり、また、一度に大量の表面処理ができる。

(3) 生理活性物質と共有結合することができる官能基である置換基Yを選択することにより表面改質、他官能基導入などの化学修飾が可能となる。

【0032】バイオセンサー用測定チップにおいては、シランカップリング剤で処理した金属表面に対し、直接又は二官能性試薬を介して、生理活性物質を固定して使用する。目的とする生理活性物質を固定化する手段としては、二官能性試薬を介して共有結合にて行うことが好ましい。

【0033】代表的な二官能性試薬としては、グルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、N、N'−o−フェニレンジマレイミド、N−スクシニミジル−4−(N−マレイミドメチル)シクロヘキサン−1−カルボキシレート、N−スクシニミジルマレイミド酢酸、N−スクシニミジル−4−マレイミド酢酸、N−スクシニミジル−6−マレイミドヘキサン酸、N−スルホスクシニミジル−4−マレイミドメチルシクロヘキサン−1−カルボン酸、N−

(6), 開2003-75447 (P2003-76ch5織)

スルホスクシニミジルー3-マレイミド安息香酸、N-(4-マレイミドブチロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(8-マレイミドカプリロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(11-マレイミドウンデカノイロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N[2-(1-ヒペラジニル)エチル]マレイミド・二塩酸、ジスルホン化合物(例えば、ジビニルスルホン化合物など)等が挙げられ、それぞれ単独で又は組み合わせて使用することができる。

【0034】本発明で用いる二官能性試薬として用いるジスルホン化合物としては、下記の式(1)で表わされるジスルホン化合物が特に好ましい。



【0035】[上記の式において、 $X^1$ および $X^2$ は互いに独立に、 $-CR^1=CR^2R^3$ 、または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ (反応性前駆体基)を表わし; $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ば

れる原子もしくは基を表わし; $Y$ は、ハロゲン原子、 $-OSO_2R^{11}$ 、 $-OCOR^{12}$ 、 $-OSO_3M$ 、及び四級ビリジニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし; $R^{11}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる基を表わし; $R^{12}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基および炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基からなる群より選ばれる基を表わし; $M$ は、水素原子、アルカリ金属原子およびアンモニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし;そして、 $L^2$ は連結基を表わす]。

【0036】上記式(1)で表わされるジスルホン化合物は、有機ケイ素膜を固定化した金属膜と、例えば水性雰囲気にて、接触させることによって、該金属膜上に導入することができる。

【0037】本発明で好ましく用いるジスルホン化合物の代表例を下記に示す。なお、ジスルホン化合物は、二種類以上を混合して用いてもよい。

【0038】

【化1】

(S1)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S2)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{OCH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S3)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S4)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S5)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S6)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S7)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON} \langle \text{cyclohexane ring} \rangle \text{NCOCH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S8)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON} \langle \text{piperidine ring} \rangle \text{NCOCH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

$$\text{COCH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S9)  

$$\text{O}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2-\langle \text{phenyl ring} \rangle \text{N}^+-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_2-\langle \text{pyridine ring} \rangle \text{N}-\text{SO}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+-\langle \text{phenyl ring} \rangle \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$$

(S10)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\langle \text{thiazole ring} \rangle \text{SO}_2-\text{SO}_2$$

(S11)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2 \\ \text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na} \end{array}$$

(S12)  

$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na})-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$$

(S13)

Chemical structure (S13) is a bis-sulfonate compound. It features a central carbon atom bonded to two methyl groups (CH<sub>3</sub>) and two 4-sulfonatephenyl groups. The sulfonate groups are represented as -O-SO<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>.

(S14)

Chemical structure (S14) is a 1,3,5-trisubstituted benzene ring. The substituents are vinyl sulfonate groups:  $\text{CH}_2=\text{CHSO}_2-$  at the 1-position,  $-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$  at the 3-position, and  $-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$  at the 5-position.

(S15)

Chemical structure (S15) is a 1,3,5-triazine derivative. It consists of a central 1,3,5-triazine ring. Attached to the 2, 4, and 6 positions of the ring are three identical groups:  $\text{SO}_2\text{CH}=\text{CHCl}$ . The structure is shown as a central ring with three  $\text{SO}_2\text{CH}=\text{CHCl}$  groups extending from it.

【0042】免疫蛋白質としては、測定対象物を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、IgA、IgE、IgDを使用することができる。具体的には、測定対象物がヒト血清アルブミンであれ



(8) 開2003-75447 (P2003-7 蒔織

ば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157などに対する抗体等を使用することができる。

【0043】酵素としては、測定対象物又は測定対象物から代謝される物質に対して活性を示すものであれば、特に限定されることがなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、測定対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、測定対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

【0044】微生物としては、特に限定されることがなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物を使用することができる。核酸としては、測定の対象とする核酸と相補的にハイブリダイズするものを使用することができる。核酸は、DNA（cDNAを含む）、RNAのいずれも使用できる。DNAの種類は特に限定されず、天然由来のDNA、遺伝子組換え技術により調製した組換えDNA、又は化学合成DNAの何れでもよい。低分子有機化合物としては通常の有機化学合成の方法で合成することができる任意の化合物が挙げられ、好ましくは、本発明で使用する一般式Iのリンカー化合物と直接又は架橋性化合物を介して結合することができるような官能基を有する化合物である。

【0045】非免疫蛋白質としては、特に限定されることがなく、例えばアビジン（ストレプトアビジン）、ビオチン又はレセプターなどを使用できる。免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテインG、リウマチ因子（RF）等を使用することができる。糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられる。脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステアリン酸、アラキジン酸、ペヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ペヘン酸エチル等が挙げられる。

【0046】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるもの

ではない。

【0047】

【実施例】実施例1：センサーチップの作成

3-メルカプトプロピルトリメトキシシランと3-アミノプロピルトリエトキシシラン（信越化学社製）の1：1の混合物の1%水溶液に、ビアコア社のSIACit Auの金薄膜チップを24時間浸した。その後蒸留水で表面を洗浄して、110℃で15分間加熱した。5重量%1，2-ビス（ビニルスルホン）アセトアミド）エタンのリン酸緩衝液（pH8.5）溶液に1時間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下乾燥し、表面にビニルスルホン基が導入されたセンサーチップを得た。

【0048】実施例2：測定

上記（1）で作製したセンサーチップを、市販の表面プラズモン共鳴バイオセンサー（ファルマシアバイオセンサー社製、BIAcore2000）のカートリッジブロック上に設置した。このセンサーに1mg/mlの抗ヒトIgG抗体を流速1μl/分で1時間流し込み、メルカプト/有機ケイ素膜の表面に抗ヒトIgGを固定化した。その後、10mMエタノールアミンでブロッキングして、さらに、未反応の抗体を洗い流すために、0.1Nの塩酸5μlを流速5μl/分で測定セルに流し込んだ。

【0049】抗体を固定化した測定チップを設置した測定セルに、0.01、0.1、1、10μg/mlに希釈したヒトIgGを流速5μl/分で10分間流しながら光強度を測定し、共鳴シグナル(RU)を求めた。比較例として、市販のSensor Chip C1（ビアコア社製）を用いて同様の実験を行った。結果を以下の表1に示す。表1の数値の単位は共鳴シグナル(RU)である。表1の結果から分かるように本発明のセンサーチップは比較例のセンサーチップよりも良好な感度で測定対象物質を測定することができ、特に、固定化する生理活性物質が少量であっても、良好な感度で測定対象物質を測定することができる。

【0050】

【表1】

IgG 濃度 (μg/ml)	本発明のチップ	比較例のチップ
0	1	1
0.01	113	12
0.1	1216	115
1	4200	809
10	5000	1100

【0051】

【発明の効果】本発明のバイオセンサー用測定チップは、製造が容易であり、また、固定化する生理活性物質が少量であっても、良好な感度で測定対象物質を測定することができる。

(9) 開2003-75447 (P2003-70FA)

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G059 AA01 BB13 EE01 EE04 FF03  
JJ21